

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06340546 A**

(43) Date of publication of application: **13.12.94**

(51) Int. Cl

A61K 37/24

A61K 37/24

C07K 13/00

(21) Application number: **03321412**

(71) Applicant: **NAKAMURA TOSHIICHI**

(22) Date of filing: **07.11.91**

(72) Inventor: **NAKAMURA TOSHIICHI**

**(54) SIDE EFFECT-PREVENTING AGENT FOR
CANCER THERAPY**

on the therapy of cancers and prevent side effects. Thereby, stronger cancer treatments can be performed than by conventional methods, and the carcinostatic effects can be improved.

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a medicinal agent capable of reducing or preventing side effects on the therapy of cancers by a chemical therapy, a radiation therapy, etc.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

CONSTITUTION: This side effect-preventing agent for the therapy of cancers contains a hepatic parenchyma cell growth factor (HGF) as an active ingredient. The HGF can moderate the damages of normal cells and tissues

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-340546

(43)公開日 平成6年(1994)12月13日

(51) Int.Cl. ⁵ A 61 K 37/24 C 07 K 13/00	識別記号 AGA ADU ZNA	序内整理番号 8314-4C 8318-4H	F I	技術表示箇所
---	---------------------------	------------------------------	-----	--------

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全33頁)

(21)出願番号 特願平3-321412

(22)出願日 平成3年(1991)11月7日

(71)出願人 591115073 中村 敏一 大阪府高槻市高見台10-27	(72)発明者 中村 敏一 福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号	(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美
--	-------------------------------------	-------------------

(54)【発明の名称】 ガン療法用副作用防止剤

(57)【要約】

【目的】 化学療法、放射線療法などによるガン治療における副作用を軽減ないし防止できる薬剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、肝実質細胞増殖因子(HGF)を有効成分とするガン療法用副作用防止剤に関する。HGFは、化学療法、放射線療法などによるガン治療において、正常細胞・組織が受ける傷害を緩和し、副作用を防止することができる。従って、より強力なガン治療を行うことが可能となり、制ガン効果の向上が図れる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝実質細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor)を有効成分として含有することを特徴とするガン療法用副作用防止剤。

【請求項2】 肝実質細胞増殖因子が、ヒト又は動物の組織又は血液成分由来である請求項1記載のガン療法用副作用防止剤。

【請求項3】 肝実質細胞増殖因子が遺伝子組換えにより製造したものである請求項1記載のガン療法用副作用防止剤。

【請求項4】 遺伝子組換えの宿主細胞が大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞の何れかである請求項3記載のガン療法用副作用防止剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はガン療法用副作用防止剤に関し、より詳細には肝実質細胞増殖因子(以下、HGFという)を有効成分として含有し、ガン治療における副作用を軽減ないし防止することのできる薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】厚生省による人口動態統計によれば、現在、わが国の死因の第一位は悪性新生物、すなわちガンであり、これまでのところ死者数は毎年増加している。我国のガン患者は推定80万人であり、毎年30万人以上の新しい患者が発生していると言われている。新規なガン治療法あるいは新規な制ガン剤の開発は医療・医薬研究者の最大の関心事であり、また今日の医療における最大の課題である。ガンの治療法としては、従来から制ガン剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生素、ホルモン類、生体反応修飾物質等)の投与、放射線の照射及び外科的処置が単独又は組み合わされて実施されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来から行われているガン療法は、主としてガン病巣の除去、消滅を目的とするものであるが、生体のトータルな機能の改善の中で治療を考える必要があり、副作用の一層の軽減を図ることの重要性が認識され、かかる見地からのガン療法が検討されている。即ち、従来の化学療法に用いられている制ガン剤は、ガン細胞と正常細胞との質的な差異が少ないため、制ガン効果の強いものほど副作用が強く、副作用のない制ガン剤は効果もないとさえいわれている。現今の中制ガン剤の毒性は不可避であるため、化学療法に際しては、この毒性を軽減しつつ、その有効性を最大限に利用することが必要である。また、放射線療法においては、本来、生体に悪影響を及ぼす放射線を利用するものであり、生体の受ける副作用も大きいので、副作用の軽減を図ることは極めて重要である。このように、ガンの化学療法及び放射線療法においては、ガン細胞のみなら

ず、正常細胞・組織も傷害を受け、例えば、骨髄抑制、恶心嘔吐、心障害、肺線維症、肝障害、腎障害、脱毛、皮膚症状等の副作用をもたらす。特に、増殖速度の高い細胞・組織は大きな傷害を受け易い。かかる副作用のため、より強力な治療を行い難い問題があり、ガン治療のネックとなっている。このような問題から、正常細胞・組織に対する毒性を軽減させるための研究がされており、 γ -グロブリン、チトクロームC、アデニン、SH化合物、ビタミンB群等が副作用防止剤として用いられることがあるが、その効果は不十分である。最近、造血組織に対する毒性の緩和にコロニー刺激因子(CSF)が用いられ、制ガン剤療法に伴う白血球減少症を軽減できることが報告されており(Motoyosi, K. et al, Exp. Hematol., 14: 1069-1075, 1986)、中胚葉由來の細胞・組織の受ける傷害の緩和にCSFが有効であることが知られているが、外胚葉・内胚葉由來の細胞・組織に対する副作用を軽減できる物質は知られておらず、かかる物質が求められている。本発明は上記の問題を解決するためになされたもので、ガン治療において、正常細胞・組織の受ける傷害を緩和し、副作用を軽減することができるガン療法用副作用防止剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、年余にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果HGFを単離精製することに成功した。本発明者は、HGFが増殖因子として肝細胞のみならず広く上皮系細胞に働くことを明らかにし、いくつかの発明を成就した。特願平2-158841号においては、HGFが腎の近位尿管細胞の増殖を促進することより、腎疾患治療剤としての応用開発を、また特願平2-419158号においては、HGFがメラノサイト、ケラチノサイトなど正常上皮細胞の増殖を促進することより、上皮細胞促進剤として創傷治療や皮膚潰瘍治療、毛根細胞の増殖剤などへの応用開発を成就し、その詳細を開示した。特に、HGFはEGF等他の多くの増殖因子に見られるガン化作用やガン細胞増殖活性を有さないことから、より実用に適している。さらに本発明者らは、特願平3-140812号においてHGFのヒト肝ガン由来HePG2細胞株、リンパ芽球ガン由来IM9細胞株などに対するガン細胞増殖抑制活性を利用し、制ガン剤としても利用可能であることを開示した。本発明者は、HGFの活性を更に研究した結果、ガン治療において正常細胞・組織が受ける傷害をHGFが緩和し、副作用を軽減できることを見出して本発明を完成した。即ち、本発明は、HGFを有効成分とするガン療法用副作用防止剤に関する。

【0005】本発明のガン療法用副作用防止剤において、有効成分であるHGFは、本発明者らが再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞をin vitroで増殖させる因子として見出した蛋白質である(Biochem Biophys Res C

ommun, 122, 1450, 1984)。本発明者らはさらに、HGFをラット血小板より単離することに成功し(FEBS Lett, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を一部決定した。さらに、本発明者らは解明されたHGFアミノ酸配列をもとにヒト及びラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、そのcDNAを動物組織に組換えてHGFを蛋白質として得ることに成功した(ヒトHGF: Nature, 342, 440, 1989; ラットHGF: Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3200, 1990)。

【0006】上記のHGFは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分子量82~85kDである。ラットHGF分子は463アミノ酸残基からなる α 鎖と233アミノ酸残基からなる β 鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造をもち、 α 、 β 両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまたほぼ同じ生理活性を有し、463アミノ酸残基からなる α 鎖と234アミノ酸残基からなる β 鎖とからなる。 α 鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、 β 鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンのB鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子の塩基配列をそれぞれ図1及び図2に示した。ヒトHGFは図1に示される728個のアミノ酸からなる前駆体として生合成され、その後463アミノ酸残基(図1の配列の第32位のGlnから第494位のArgまで)からなる α 鎖と、234アミノ酸残基(図1の配列の第495位のValから第728位のSerまで)からなる β 鎖にわかれる。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーは α 鎖において91.6%、 β 鎖において88.9%と非常に高い相同性をもち、その活性は全く互換性がある。

【0007】上記のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを产生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる(Nature, 342, 440, 1989)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

【0008】より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば参考例1に示すようにラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパ

リンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することができる。あるいは参考例2に示すように遺伝子組換え法を用い、図2に示したヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウイルスDNAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、マウスC127細胞や、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

- 10 【0009】こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていて、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び/又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖類が同様に欠失又は置換されてもよい。かかるHGF同効物としては、例えば、特開平3-130091号公報、国際公開WO90/10651号公報などに記載の物質が挙げられ、これらも本発明に適用でき、本発明の範囲に含まれる。本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであってもよく、またいずれの哺乳動物のガン治療に対しても有効な副作用防止作用を示す。すなわち、本発明の薬剤はヒトの医薬品のみならず動物用医薬品としても用いることができる。
- 【0010】本発明のガン療法用副作用防止剤は、制ガン剤による化学療法や放射線療法と併用してガン治療に利用され、それらの処置に起因する副作用の低減を図ることが可能となる。HGFは肝細胞、腎の近位尿細管細胞の増殖を促進するので、肝障害、腎障害の緩和が図れるが、広く上皮系細胞に対しても増殖促進作用を有するので、悪心・嘔吐、脱毛などの副作用も軽減できる。即ち、悪心・嘔吐は消化管上皮細胞が損傷を受け、近位の末梢神経が刺激されて生ずるものであり、また脱毛は毛根周辺の増殖の激しい組織が損傷を受けるために生ずるものである。HGFは、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトを含め、主として外胚葉・内胚葉由来の細胞・組織に対して選択的に増殖促進作用を及ぼすので、これらの細胞・組織に対する制ガン剤及び放射線の副作用を軽減し、より強力なガン治療法の適用を可能とし、制ガン効果の向上が図れる。また、HGFで処理された細胞は細胞傷害を受けにくくなるので、化学療法及び放射線療法に際しての前処置剤としても有用であり、HGFで前処置をすることにより、副作用を予防することができる。HGFの医薬品としての実用性を考える上でさらに重要な点は、HGFがG1期、すなわち増殖期に入った細胞のみを増殖促進し、G0期、すなわち静止期にある細胞には作用しないことである。このことは、傷害のある組織の増殖再生は促進するが、傷害を受けていない組織に対しては全く作用を及ぼさないことを意味する。
- 40 50 従って、過剰にHGFを投与しても、あるいは血液など

を介して非患部にHGFが到達しても、正常組織にガン化を誘導したり過剰な増殖を起こすことがないと考えられる。

【0011】本発明の副作用防止剤は種々の製剤形態(例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など)をとりうるが、一般的には有効成分であるHGF単独若しくは慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に外用薬とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、HGFを適切な溶剤(例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等)に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のHGF含量としては、通常0.0002~0.2(W/V%)程度、好ましくは0.01~0.1(W/V%)程度に調整される。また、外用薬としては、例えば、軟膏状、ゲル状、液状などの剤形に製剤化され、製剤中のHGF含量は、外用薬の適用疾患、適用部位などに応じて適宜調整することができる。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の薬剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでいてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。

【0012】本発明の副作用防止剤は該製剤組成物の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、通常HGFとして0.01mg~100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

【0013】

【発明の効果】本発明のガン療法用副作用防止剤はHGFを有効成分として含有し、HGFは化学療法、放射線療法等における正常細胞・組織が受ける傷害を緩和し、副作用を軽減できるので、より強力なガン治療を行うことが可能となり、制ガン効果の向上が図れるので、臨床上極めて有用である。また、HGFは正常上皮系細胞のみ増殖促進し、肝非実質細胞や線維芽細胞など正常間葉系細胞の増殖になんら影響せず、また細胞をガン化させる活性を持たないため、特異性の高い、また副作用の少ない薬剤とすることができる。

【0014】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために参考例、試験例及び実施例を挙げるが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

参考例1

ラット肝臓からのHGFの単離

Wister系ラットに体重の0.2%の量の四塩化炭素を、腹腔

内投与し投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓はワーリングブレンダーで破碎後、日立20PR-52型冷却遠心機を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。上清を、0.15M NaCl、10mMペース、2mM CaCl₂及び0.01%Tween80を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4°C一夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)(ファルマシア社製)カラムに注入し、洗浄後NaClの濃度勾配により溶出を行い、HGFはNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次にこのHGF

10 をブルートリスアクリルM(IBF社製)クロマトグラフィーにて精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた分画を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5 PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少及びエチレングリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓当たり10μgのHGFが得られた。精製HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFは0.25%BSA(牛血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

【0015】参考例2

遺伝子組換え法によるHGFの製造

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来のHGFを製造した。Wiglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子により形質転換されたチャイニーズハムスター

30 卵巣(CHO)細胞を培養し、その培養上清より、ヒトHGFを得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから造られたcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAフラグメントをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結して挿入し、pBS[hHGF11]を得た。pBS[hHGF11]をXbaIとSalIとNaeIで消化し、更にT₄DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒトHGFをコードする約3KbのDNAフラグメントをウシパピローマウィルスDNAをベクターとする発現ベクターpBPM'TのEcoRV部位に挿入し、pBPM'T[hHGF11]を得た。得られたHGF発現ベクターpBPM'T[hHGF11]を用いて、DEAEデキストラン法によりCHO細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中

40 から、高いHGF産生能を示す細胞株BPH89を選びだした。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高いHGF産生能を示す細胞株BPH89を選びだした。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高いHGF産生能を示す細胞株BPH89を選びだした。

殖させた後、培地を2日おきに交換して、HGFを実施
例1の精製法に準じた方法により精製した。

【0016】参考例3

成熟ラット肝細胞の単離及び初代培養

成熟ラット肝実質細胞は、Seglenの方法(Meth. Cell Biol. 13: 29-33, 1976)に準じて、コラーゲンを用いた肝臓の灌流により単離した。初代培養の概要は以下のとおりである。ウイリアムズ培地(5%ウシ血清、10⁻⁹Mインスリン及び10⁻⁹Mデキサメゾン含有)に分散させた単離肝細胞を、I型コラーゲンでコーティングした12穴プラスチックディッシュ(コーニング社製)に蒔いた。培養培地は2時間後に血清及びホルモンを含有せず、0.5μg/mlのアプロチニンを含有する培地に交換した。

【0017】本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFの肝細胞保護作用を下記試験例1~4に示す。HGFの肝細胞保護作用は、初代培養肝細胞からの細胞質酵素の漏出により試験した。即ち、四塩化炭素は肝毒性物質であり、生体内で肝炎を引き起こす。この四塩化炭素を実験動物に投与すると、投与量に応じて肝臓からグルタメートオキサロアセテートトランスフェラーゼ(GOT)、グルタメートピルベートアミノトランスフェラーゼ(GPT)、ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)などの細胞質酵素を血液中に漏出する。この現象を模して、初代培養肝細胞に肝毒性物質を添加した系で、GOTなどの細胞質酵素を漏出させ、この系にHGFを添加し、GOTなどの細胞質酵素の漏出を抑制する程度によりHGFの肝細胞保護作用を試験した。なお、以下の試験例1~4において、HGFは参考例2の方法に準じて調製した組換え体ヒトHGFを用いた。また、四塩化炭素溶液は、四塩化炭素をDMFに1Mとなるように溶解し、次いでウイリアムズ培地で希釈し、最終濃度が5mMとなるように調整した溶液を用いた。

【0018】試験例1

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)及び/又は四塩化炭素(5mM)を添加した。所定時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図3に示す。なお、同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系である。図3に示されるように、四塩化炭素のみを添加した系においては、培地へのGOTの漏出が認められ、細胞が傷害を受けている。それに対し、HGFを共存させた系においては、GOTの漏出はコント*

* ロールと同程度であり、細胞傷害が抑制されていることが明らかとなった。なお、上記の上清中のLDH活性及びGPT活性についても測定したが、これらの酵素の肝細胞からの漏出もHGFの存在により抑制されていることが確認された。

【0019】試験例2

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、最終濃度で3mMの四塩化炭素を加え、更に種々の濃度のHGFを添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図4に示す。なお、四塩化炭素を添加していない系(コントロール)における24時間後のGOT活性は6.0mU/mlであった。図4に示されるように、肝細胞からのGOTの漏出は、HGFにより0~8ng/mlの範囲で用量依存的に抑制され、HGFが肝細胞保護作用を有することが明らかとなった。

【0020】試験例3

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、所定時間、HGF(10ng/ml)又は四塩化炭素(5mM)に曝した。翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)及び/又は四塩化炭素(5mM)を添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図5に示す。同図中、0hは培地交換時を示し、また白抜きバーは細胞を四塩化炭素に曝した時間を、淡点付きバーは細胞をHGFに曝した時間を示す。図5に示されるように、四塩化炭素に曝す前に細胞をHGFで処理した場合にもGOTの漏出は抑制され、また四塩化炭素に曝された細胞にHGFを添加した場合であってもGOTの漏出は抑制された。

【0021】試験例4

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)並びに四塩化炭素(5mM)又はマイトイシンC(8μM)を添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を表1に示す。表1に示されるように、HGFは、肝毒性物質である四塩化炭素及びマイトイシンCによるGOTの漏出を抑制していることが明らかとなった。

【0022】

表1

肝毒性物質	GOT活性 (mU/ml)	
	無添加	10ng/ml HGF
対照(0.5% DMSO)	6.0±0.4	4.8±0.2
四塩化炭素(5mM)	12.7±1.2	4.9±0.2
マイトイシンC(8μM)	13.5±1.3	5.2±0.3

【0023】試験例5

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果を下記の方法で確認した。

ラット腎近位尿細管細胞の単離

バルビタール系麻酔剤によりWister系ラットを麻酔し、腹部を切開して腎臓を摘出し、氷で冷却したプレートに取り出した。皮質部分を集め、小片に刻んでダウスホモジナイザーにかけた。得られたホモジエネートを245 μm孔ナイロンメッシュで濾過し、さらに尿細管細胞と顆粒細胞を分離するために105 μm孔ナイロンメッシュで濾過した後、メッシュ上に残った画分を氷で冷却したイーグルの最少栄養培地に移した。この画分に少量の顆粒細胞が残存していたので、0.01%コラゲナーゼを培地に添加し37°Cで3分間処理し、フィプロプラストを除去した後、80g×2分間の遠心分離を行い、精製近位尿細管細胞を得た。

【0024】HGFの近位尿細管細胞に対する増殖活性

上記で単離した腎近位尿細管細胞の培養系にHGFを添加し、細胞増殖効果をDNA合成の増加により調べた。すなわち、上記により得られた近位尿細管細胞を、1×10³Mインスリン(シグマ社、米国)、1×10⁻⁸Mデキサメゾン(和光純薬社)、5 μg/mlトランスフェリン(シグマ社、米国)、5 U/mlアプロチニン(持田製薬社)を添加したDME・F-12混合培地(DME培地:F-12培地=1:1、日本水産社)に懸濁し、24穴のマルチプレートに4×10⁴個/ウェルの濃度で蒔いた。5%CO₂、30%O₂、6.5%N₂の存在下、37°Cで24時間培養後、5 U/mlアプロチニンを添加したDME・F-12混合培地に交換し、同培養条件下で48時間培養した。培地を新しく調製した5 U/mlアプロチニン添加DME・F-12混合培地に交換すると共に被検試料として参考例1で得られたラットHGF(0.25%BSAを加え、PBSで透析したもの)、及び陽性対照として10ng/mlEGF(上皮細胞成長因子、雄マウス頸下腺由来)+1×10⁻⁸Mインスリンを所定量添加した。16時間培養後、1 μCi/mlの[¹²⁵I]デオキシリジン(ニューイー

*シングランドニューヨークレア社、米国)10 μl/ウェルを添加した。4時間後、PBSで細胞を洗浄し、10%トリクロロ酢酸溶液に移し、5分間インキュベートした。トリクロロ酢酸を除去し、1M水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、放射能をガンマカウンターにて測定した。その結果を図6に示す。図6から明らかのように、ラットHGFはラット腎臓の近位尿細管細胞を用量依存的に増殖させる活性を示した。すなわち、2ng/mlのHGFを添加することにより、該培養細胞のDNA合成は約2倍に、10 ng/mlのHGFにより約3倍に促進された。これにより本発明の有効成分であるHGFは培養腎細胞を増殖させる活性を有することが明らかになると共に、生体内における腎再生を促進させる活性を有することが明らかとなった。

【0025】試験例6

ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。MCDB153(高アミノ酸タイプ)培地にインスリン5 μg/ml、ヒドロコチゾン0.5 μg/ml、フォルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト(クラボウ株式会社)を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、2.5%O₂、6.5%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果を図7に示す。図7に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

【0026】試験例7
ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

*試験例6に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メ

ラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個／ウェルになるように蒔き、10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマーカウンターにより測定した。また、放射能測定後の試料の一部をとてMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当たりに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。その結果を図8に示す。図8に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成が促進され、最適濃度において約4倍にまで高められることが確認された。

【0027】試験例8

ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。試験例6に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 10^4 個／ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培養を続け、4日後(培養開始から10日後)培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果を図9に示す。図9に示されるように、正常ケラチノサイトはHGFにより0から2.5ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

【0028】試験例9

ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

試験例6記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個／ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20

ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて2回洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマーカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとてMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当たりに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。その結果を図10に示す。図10に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から5ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

【0029】実施例1

生理食塩水100ml中にHGF 100mg、マンニトール1g及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【0030】実施例2

0.15M NaClと0.01%ポリソルベート80を含むpH7.4の0.02Mリン酸緩衝液100mlにHGF 100mgとヒト血清アルブミン100mgを添加した水溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【図面の簡単な説明】

30 【図1】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(図1)をコードする遺伝子の塩基配列を示す図である。

【図3】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出量の時間変化を示す図である。同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系を示す。

40 【図4】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果(添加量-応答曲線)を示す図である(試験例2参照)。

【図5】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果を示す図である(試験例3参照)。

【図6】ラット近位尿細管細胞に対するラットHGFの増殖促進活性の測定結果を示す図である(試験例5参照)。同図中、●はHGFを添加した系、□はEGF+インスリン(陽性対照)を示す。

50 【図7】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性(細胞数)を示す図である(試験例6参照)。

13

14

【図8】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性（複製DNA合成）を示す図である（試験例7参照）。

【図9】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性（細胞数）を示す図である（試験例8参 * ）

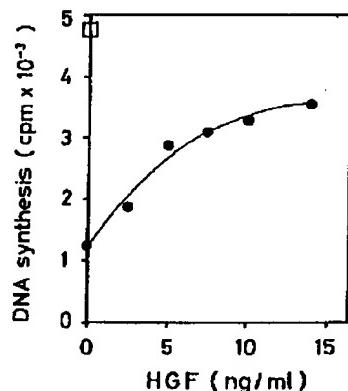
* 照)。

【図10】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性（複製DNA合成）を示す図である（試験例9参照）。

【图 1】

1	5	10
Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Ile Gln His Val		
	20	25
Leu Leu His Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu		30
	35	40
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser		45
	50	55
Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys		60
	65	70
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr		75
	80	85
Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp		90
	95	100
Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser		105
	110	115
Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu		120
	125	130
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser		135
	140	145
Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln		150
	155	160
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser		165
	170	175
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		180
	185	190
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Arg Glu		195
	200	205
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu		210
	215	220
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His		225
	230	235
Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro		240

【圖 6】



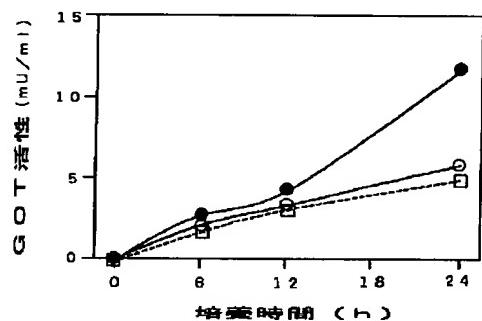
(つづきあり)

【図2】

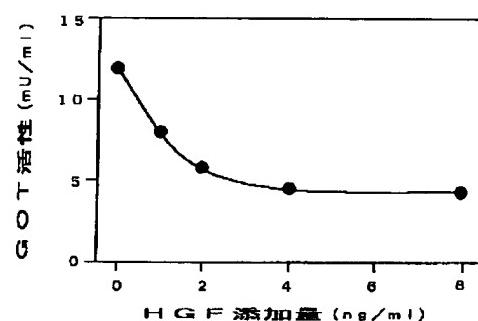
ATGTGGTGA CCAAACCTCCT GCCAGCCCTG CTGCTGCAGC ATGTCCCTGCATCTCCTC 60
 CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
 GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA 180
 ACCAAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAAAGGACTT 240
 CCATTCACTT GCAAGGCTTT TGTTTTGAT AAAGCAAGAA AACAAATGCCCT CTGGTTCCCC 300
 TTCAATAGCA TGTCAAGTGG AGTGAAAAAA GAATTGGCC ATGAATTGAA CCTCTATGAA 360
 AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT CCTAAAGGAC GCAGCTACAA CGCAACACTA 420
 TCTATCACTA AGAGTGGCAT CAAATGTCAAG CCCTGGAGTT CCATGATACC ACACGAACAC 480
 AGCTTTTGC CTCGGAGCTA TCGGGGTAAA GACCTACAGG AAAACTACTG TCGAAATCCT 540
 CGACGGGAAG AACGGGGACC CTGGTGTTC ACAAGCAATC CAGAGGTACG CTACGAAGTC 600
 TGTGACATTG CTCAGTGTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGGAA GAGTTATCGA 660
 GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTTGTCAAG GCTGGGATCA TCAGACACCA 720
 CACCGGCACA AATTCTTCCC TGAAAGATAT CCCGACAAGG CCTTTGATGA TAATTATTGC 780
 CGCAATCCCG ATGCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCCTCA CACCCGCTGG 840
 GAGTACTGTG CAATTAAAAC ATGCGCTGAC AATACTATGA ATGACACTGA TGTTCCTTGC 900
 GAAACAAC TGAAATGCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCATT 960
 TCGAATGGAA TTCCATGTCA CGCTGGGAT TCTCACTATC CTCACCGAGCA TGACATGACT 1020
 CCTGAAAATT TCAACTGCAA GGACCTACGA GAAAATTACT GCCGAAATCC AGATGGTCT 1080
 GAATCACCCCT GGTGTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGCTACTG CTCCCAATT 1140
 CGAAACTGTG ATATGTCACA TCGACAAGAT TGTTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1200
 GGGAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGGACAA GAACATGGAA 1260
 GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1320
 CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGCTACA CGGGAAATCC ACTCATTCCCT 1380
 TGGGATTATT GCCCTATTTG TCGTTGTGAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTAA 1440
 GACCATCCCG TAATATCTTG TCCCAAAACG AAACAATTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
 ACACCAACAA ACATAGGATG GATGGTTACT TTGAGATACA CAAATAAACAA TATCTGCCCA 1560

(つづきあり)

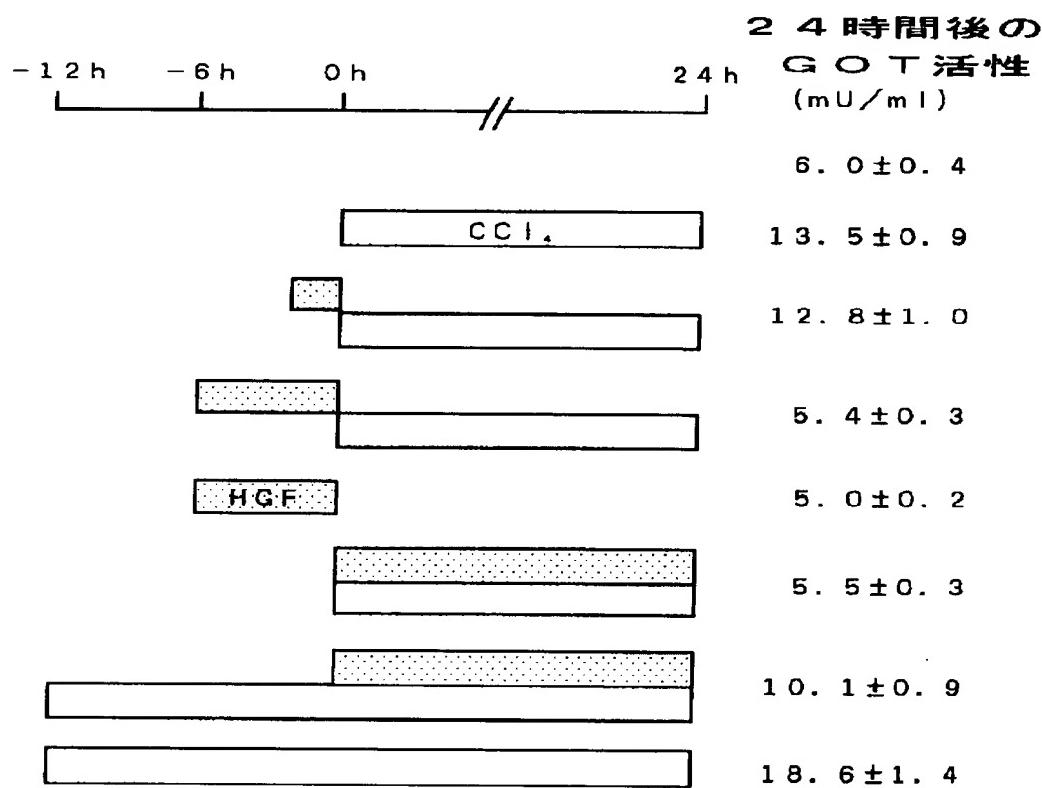
【図3】



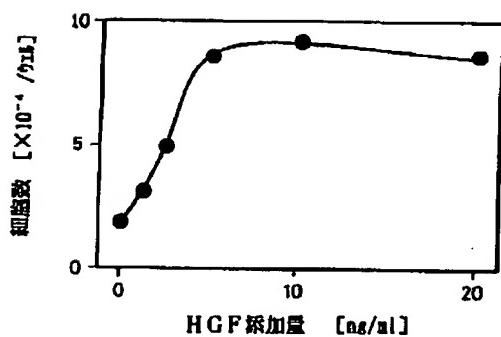
【図4】



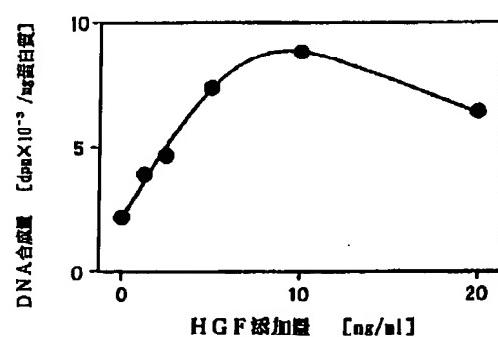
【図5】



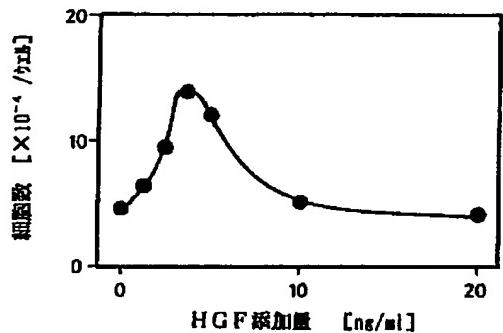
【図7】



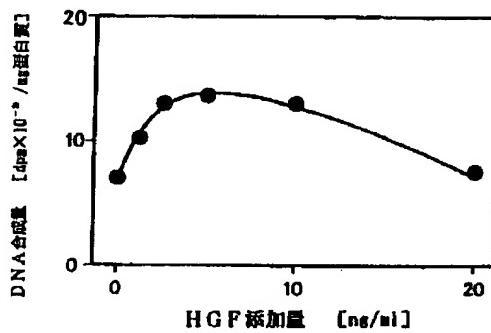
【図8】



【図9】



【図10】



GGATCATTCA TAAAGGAGAC TTGGCTTCTT ACTGCACGAC AGTCTTCCC TTCTCGACAC 1620
 TTGAAAGATT ATGAACCTTG GCTTGAAATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
 TGC AACACAGG TTCTCAATGT TTCCCAGCTG GTATATGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
 TTAATGAAGC TTGCCAGGCC TGCTGTCCTG CATGATTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
 AATTATGGAT GCACAATTCC TCAAAAGACC AGTTGCAGTC TTTATGGCTC CCCCTACACT 1860
 GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
 AAATGCAGCC AGCATCATCG AGGGAAAGGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
 GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTTTGAG 2040
 CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTGTC ATTGTTCTG GTCGTGGATG TGCCATTCCA 2100
 AATCGTCCTG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAAATTATT 2160
 TTAACATATA AGGTACCACCA GTCA 2184

245	250	255
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
260	265	270
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
275	280	285
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
290	295	300
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
305	310	315
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
320	325	330
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asp Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
335	340	345
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		
350	355	360
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
365	370	375
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
380	385	390
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp		
395	400	405
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
410	415	420
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu		
425	430	435
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu		
440	445	450
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro		
455	460	465
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro		
470	475	480
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
485	490	495
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val		

(つづきあり)

500 505 510
 Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser

515 520 525
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys

530 535 540
 Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp

545 550 555
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly

560 565 570
 Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu

575 580 585
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala

590 595 600
 Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro

605 610 615
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr

620 625 630
 Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg

635 640 645
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His

650 655 660
 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly

665 670 675
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly

680 685 690
 Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val

695 700 705
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile

710 715 720
 Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile

725 728
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser

【手続補正書】

【提出日】平成5年2月5日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】ガン療法用副作用防止剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】肝実質細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor)を有効成分として含有することを特徴とするガン療法用副作用防止剤。

【請求項2】 肝実質細胞増殖因子が、ヒト又は動物の組織又は血液成分由来である請求項1記載のガン療法用副作用防止剤。

【請求項3】 肝実質細胞増殖因子が遺伝子組換えにより製造したものである請求項1記載のガン療法用副作用防止剤。

【請求項4】 遺伝子組換えの宿主細胞が大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞の何れかである請求項3記載のガン療法用副作用防止剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はガン療法用副作用防止剤に関し、より詳細には肝実質細胞増殖因子(以下、HGFという)を有効成分として含有し、ガン治療における副作用を軽減ないし防止することのできる薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 厚生省による人口動態統計によれば、現在、わが国の死因の第一位は悪性新生物、すなわちガンであり、これまでのところ死亡者数は毎年増加している。我国のガン患者は推定80万人であり、毎年30万人以上の新しい患者が発生していると言われている。新規なガン治療法あるいは新規な制ガン剤の開発は医療・医薬研究者の最大の関心事であり、また今日の医療における最大の課題である。ガンの治療法としては、従来から制ガン剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生素質、ホルモン類、生体反応修飾物質等)の投与、放射線の照射及び外科的処置が単独又は組み合わされて実施されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 従来から行われているガン療法は、主としてガン病巣の除去、消滅を目的とするものであるが、生体のトータルな機能の改善の中で治療を考える必要があり、副作用の一層の軽減を図ることの重要性が認識され、かかる見地からのガン療法が検討されている。即ち、従来の化学療法に用いられている制ガン剤は、ガン細胞と正常細胞との質的な差異が少ないので、制ガン効果の強いものほど副作用が強く、副作用のない制ガン剤は効果もないとさえいわれている。現今の中の制ガン剤の毒性は不可避であるため、化学療法に際しては、この毒性を軽減しつつ、その有効性を最大限に利用することが必要である。また、放射線療法においては、本来、生体に悪影響を及ぼす放射線を利用するものであり、生体の受ける副作用も大きいので、副作用の軽減を図ることは極めて重要である。このように、ガンの化学療法及び放射線療法においては、ガン細胞のみならず、正常細胞・組織も傷害を受け、例えば、骨髄抑制、恶心嘔吐、心障害、肺線維症、肝障害、腎障害、脱毛、皮膚症状等の副作用をもたらす。特に、増殖速度の高い細胞・組織は大きな傷害を受け易い。かかる副作用のた

め、より強力な治療を行い難い問題があり、ガン治療のネックとなっている。このような問題から、正常細胞・組織に対する毒性を軽減させるための研究がされており、γ-グロブリン、チトクロームC、アデニン、SH化合物、ビタミンB群等が副作用防止剤として用いられることがあるが、その効果は不十分である。最近、造血組織に対する毒性の緩和にコロニー刺激因子(CSF)が用いられ、制ガン剤療法に伴う白血球減少症を軽減できることが報告されており(Motoyosi, K. et al, Exp. Hematol., 14: 1069-1075, 1986)、中胚葉由来の細胞・組織の受ける傷害の緩和にCSFが有効であることが知られているが、外胚葉・内胚葉由来の細胞・組織に対する副作用を軽減できる物質は知られておらず、かかる物質が求められている。本発明は上記の問題を解決するためになされたもので、ガン治療において、正常細胞・組織の受ける傷害を緩和し、副作用を軽減することができるガン療法用副作用防止剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、年余にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果HGFを単離精製することに成功した。本発明者は、HGFが増殖因子として肝細胞のみならず広く上皮系細胞に働くことを明らかにし、いくつかの発明を成就した。特願平2-158841号においては、HGFが腎の近位尿細管細胞の増殖を促進することより、腎疾患治療剤としての応用開発を、また特願平2-419158号においては、HGFがメラノサイト、ケラチノサイトなど正常上皮細胞の増殖を促進することより、上皮細胞促進剤として創傷治療や皮膚潰瘍治療、毛根細胞の増殖剤などへの応用開発を成就し、その詳細を開示した。特に、HGFはEGF等他の多くの増殖因子に見られるガン化作用やガン細胞増殖活性を有さないことから、より実用に適している。さらに本発明者らは、特願平3-140812号においてHGFのヒト肝ガン由来HePG2細胞株、リンパ芽球ガン由来IM9細胞株などに対するガン細胞増殖抑制活性を利用し、制ガン剤としても利用可能であることを開示した。本発明者は、HGFの活性を更に研究した結果、ガン治療において正常細胞・組織が受ける傷害をHGFが緩和し、副作用を軽減できることを見出して本発明を完成した。即ち、本発明は、HGFを有効成分とするガン療法用副作用防止剤に関する。

【0005】 本発明のガン療法用副作用防止剤において、有効成分であるHGFは、本発明者らが再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞をin vitroで増殖させる因子として見出した蛋白質である(Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984)。本発明者らはさらに、HGFをラット血小板より単離することに成功し(FEBS Letter, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を一部決定した。さらに、本発明者らは解明されたHGFアミノ酸配

列をもとにヒト及びラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、そのcDNAを動物組織に組換えてHGFを蛋白質として得ることに成功した（ヒトHGF：Nature, 342, 440, 1989; ラットHGF：Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3200, 1990）。

【0006】上記のHGFは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分子量82～85kDである。ラットHGF分子は463アミノ酸残基からなるα鎖と233アミノ酸残基からなるβ鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造をもち、α、β両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまたほぼ同じ生理活性を有し、463アミノ酸残基からなるα鎖と234アミノ酸残基からなるβ鎖とからなる。α鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、β鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンのB鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子の塩基配列をそれぞれ図1～図3及び図4～図5に示した。ヒトHGFは図1～図3に示される728個のアミノ酸からなる前駆体として合成され、その後463アミノ酸残基（図1の配列の第32位のGlnから図2の配列の第494位のArgまで）からなるα鎖と、234アミノ酸残基（図2の配列の第495位のValから図3の配列の第728位のSerまで）からなるβ鎖にわかれる。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーはα鎖において91.6%、β鎖において88.9%と非常に高い相同性をもち、その活性は全く互換性がある。

【0007】上記のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる（Nature, 342, 440, 1989）。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

【0008】より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば参考例1に示すようにラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することができる。あるいは参考例2に示すように遺伝子組換え法を用い、図4～図5に示したヒトH

GFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウィルスDNAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、マウスC127細胞や、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

【0009】こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていて、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖類が同様に欠失又は置換されていてもよい。かかるHGF同効物としては、例えば、特開平3-130091号公報、国際公開WO90/10651号公報などに記載の物質が挙げられ、これらも本発明に適用でき、本発明の範囲に含まれる。本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであってもよく、またいずれの哺乳動物のガン治療に対しても有効な副作用防止作用を示す。すなわち、本発明の薬剤はヒトの医薬品のみならず動物用医薬品としても用いることができる。

【0010】本発明のガン療法用副作用防止剤は、制ガン剤による化学療法や放射線療法と併用してガン治療に利用され、それらの処置に起因する副作用の低減を図ることが可能となる。HGFは肝細胞、腎の近位尿細管細胞の増殖を促進するので、肝障害、腎障害の緩和が図れるが、広く上皮系細胞に対しても増殖促進作用を有するので、悪心・嘔吐、脱毛などの副作用も軽減できる。即ち、悪心・嘔吐は消化管上皮細胞が損傷を受け、近位の末梢神経が刺激されて生ずるものであり、また脱毛は毛根周辺の増殖の激しい組織が損傷を受けるために生ずるものである。HGFは、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトを含め、主として外胚葉・内胚葉由来の細胞・組織に対して選択的に増殖促進作用を及ぼすので、これらの細胞・組織に対する制ガン剤及び放射線の副作用を軽減し、より強力なガン治療法の適用を可能とし、制ガン効果の向上が図れる。また、HGFで処理された細胞は細胞傷害を受けにくくなるので、化学療法及び放射線療法に際しての前処置剤としても有用であり、HGFで前処置をすることにより、副作用を予防することができる。HGFの医薬品としての実用性を考える上でさらに重要な点は、HGFがG1期、すなわち増殖期に入った細胞のみを増殖促進し、G0期、すなわち静止期にある細胞には作用しないことである。このことは、傷害のある組織の増殖再生は促進するが、傷害を受けていない組織に対しては全く作用を及ぼさないことを意味する。従って、過剰にHGFを投与しても、あるいは血液などを介して非患部にHGFが到達しても、正常組織にガン化を誘導したり過剰な増殖を起こすことがないと考えられる。

【0011】本発明の副作用防止剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるHGF単独若しくは慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に外用薬とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、HGFを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のHGF含量としては、通常0.0002～0.2(W/V%)程度、好ましくは0.01～0.1(W/V%)程度に調整される。また、外用薬としては、例えば、軟膏状、ゲル状、液状などの剤形に製剤化され、製剤中のHGF含量は、外用薬の適用疾患、適用部位などに応じて適宜調整することができる。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の薬剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでいてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。

【0012】本発明の副作用防止剤は該製剤組成物の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、通常HGFとして0.01mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

【0013】

【発明の効果】本発明のガン療法用副作用防止剤はHGFを有効成分として含有し、HGFは化学療法、放射線療法等における正常細胞・組織が受ける傷害を緩和し、副作用を軽減できるので、より強力なガン治療を行うことが可能となり、制ガン効果の向上が図れるので、臨床上極めて有用である。また、HGFは正常上皮系細胞のみ増殖促進し、肝非実質細胞や線維芽細胞など正常間葉系細胞の増殖になんら影響せず、また細胞をガン化させる活性を持たないため、特異性の高い、また副作用の少ない薬剤とすることができる。

【0014】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために参考例、試験例及び実施例を挙げるが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

参考例1

ラット肝臓からのHGFの単離

Wister系ラットに体重の0.2%の量の四塩化炭素を、腹腔内投与し投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓はワーリングブレンダーで破碎後、日立20PR-52型冷却遠心機を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。上清

を、0.15M NaCl、10mMヘペス、2mM CaCl₂及び0.01%Tween80を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4℃一昼夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)（ファルマシア社製）カラムに注入し、洗浄後NaClの濃度勾配により溶出を行い、HGFはNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次にこのHGFをブルートリスアクリルM(I BF社製)クロマトグラフィーにて精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた分画を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5 PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少及びエチレングリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓当たり10μgのHGFが得られた。精製HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFは0.25%BSA(牛血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

【0015】参考例2

遺伝子組換え法によるHGFの製造

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来のHGFを製造した。Wiglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子により形質転換されたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を培養し、その培養上清より、ヒトHGFを得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから造られたcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAragmentをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結して挿入し、pBS[hHGFII]を得た。pBS[hHGFII]をXbaIとSalIとNaeIで消化し、更にT-DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒトHGFをコードする約3KbのDNAfragmentをウシパピローマウィルスNDAをベクターとする発現ベクターpBPM'TのEcoRV部位に挿入し、pBPM'T[hHGFII]を得た。得られたHGF発現ベクターpBPM'T[hHGFII]を用いて、DEAEデキストラン法によりCHO細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高いHGF産生能を示す細胞株BPH89を選びだした。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させた後、培地を2日おきに交換して、HGFを実施例1の精製法に準じた方法により精製した。

【0016】参考例3

成熟ラット肝細胞の単離及び初代培養

成熟ラット肝実質細胞は、Seglenの方法(Meth. Cell Biol. 13: 29-33, 1976)に準じて、コラーゲンを用いた肝臓の灌流により単離した。初代培養の概要は以下のとおりである。ウイリアムズ培地(5%ウシ血清、10⁻³Mインスリン及び10⁻³Mデキサメサン含有)に分散させた単離肝細胞を、I型コラーゲンでコーティングした12穴プラスチックディッシュ(コーニング社製)に蒔いた。培養培地は2時間後に血清及びホルモンを含有せず、0.5μg/mlのアプロチニンを含有する培地に交換した。

【0017】本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFの肝細胞保護作用を下記試験例1～4に示す。HGFの肝細胞保護作用は、初代培養肝細胞からの細胞質酵素の漏出により試験した。即ち、四塩化炭素は肝毒性物質であり、生体内で肝炎を引き起こす。この四塩化炭素を実験動物に投与すると、投与量に応じて肝臓からグルタメートオキサロアセテートトランスフェラーゼ(GOT)、グルタメートピルベートアミノトランスフェラーゼ(GPT)、ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)などの細胞質酵素を血液中に漏出する。この現象を模して、初代培養肝細胞に肝毒性物質を添加した系で、GOTなどの細胞質酵素を漏出させ、この系にHGFを添加し、GOTなどの細胞質酵素の漏出を抑制する程度によりHGFの肝細胞保護作用を試験した。なお、以下の試験例1～4において、HGFは参考例2の方法に準じて調製した組換え体ヒトHGFを用いた。また、四塩化炭素溶液は、四塩化炭素をDMFに1Mとなるように溶解し、次いでウイリアムズ培地で希釈し、最終濃度が5mMとなるように調整した溶液を用いた。

【0018】試験例1

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)及び/又は四塩化炭素(5mM)を添加した。所定時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図6に示す。なお、同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系である。図6に示されるように、四塩化炭素のみを添加した系においては、培地へのGOTの漏出が認められ、細胞が傷害を受けている。それに対し、HGFを共存させた系においては、GOTの漏出はコントロールと同程度であり、細胞傷害が抑制されていること

が明らかとなった。なお、上記の上清中のLDH活性及びGPT活性についても測定したが、これらの酵素の肝細胞からの漏出もHGFの存在により抑制されていることが確認された。

【0019】試験例2

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、最終濃度で3mMの四塩化炭素を加え、更に種々の濃度のHGFを添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図7に示す。なお、四塩化炭素を添加していない系(コントロール)における24時間後のGOT活性は6.0mU/mlであった。図7に示されるように、肝細胞からのGOTの漏出は、HGFにより0～8ng/mlの範囲で用量依存的に抑制され、HGFが肝細胞保護作用を有することが明らかとなった。

【0020】試験例3

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、所定時間、HGF(10ng/ml)又は四塩化炭素(5mM)に曝した。翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)及び/又は四塩化炭素(5mM)を添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図8に示す。同図中、0hは培地交換時を示し、また白抜きバーは細胞を四塩化炭素に曝した時間を、淡点付きバーは細胞をHGFに曝した時間を示す。図8に示されるように、四塩化炭素に曝す前に細胞をHGFで処理した場合にもGOTの漏出は抑制され、また四塩化炭素に曝された細胞にHGFを添加した場合であってもGOTの漏出は抑制された。

【0021】試験例4

参考例3に示した初代培養肝細胞を1.2×10⁵細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)並びに四塩化炭素(5mM)又はマイトイシンC(8μM)を添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を表1に示す。表1に示されるように、HGFは、肝毒性物質である四塩化炭素及びマイトイシンCによるGOTの漏出を抑制していることが明らかとなった。

【0022】

表1

肝毒性物質	GOT活性 (mU/ml)	
	無添加	10ng/ml HGF
対照(0.5% DMSO)	6.0±0.4	4.8±0.2
四塩化炭素(5mM)	12.7±1.2	4.9±0.2
マイトイマイシンC(8μM)	13.5±1.3	5.2±0.3

【0023】試験例5

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果を下記の方法で確認した。

ラット腎近位尿細管細胞の単離

バルビタール系麻酔剤によりWister系ラットを麻酔し、腹部を切開して腎臓を摘出し、氷で冷却したプレートに取り出した。皮質部分を集め、小片に刻んでダウヌスホモジナイザーにかけた。得られたホモジェネートを245 μm孔ナイロンメッシュで濾過し、さらに尿細管細胞と顆粒細胞を分離するために105 μm孔ナイロンメッシュで濾過した後、メッシュ上に残った画分を氷で冷却したイーグルの最少栄養培地に移した。この画分に少量の顆粒細胞が残存していたので、0.01%コラゲナーゼを培地に添加し37°Cで3分間処理し、フィプロプラストを除去した後、80g×2分間の遠心分離を行い、精製近位尿細管細胞を得た。

【0024】HGFの近位尿細管細胞に対する増殖活性

上記で単離した腎近位尿細管細胞の培養系にHGFを添加し、細胞増殖効果をDNA合成の増加により調べた。すなわち、上記により得られた近位尿細管細胞を、1×10³Mインスリン(シグマ社、米国)、1×10⁻⁷Mデキサメザン(和光純薬社)、5 μg/mlトランスフェリン(シグマ社、米国)、5 U/mlアプロチニン(持田製薬社)を添加したDME・F-12混合培地(DME培地:F-12培地=1:1、日本水産社)に懸濁し、24穴のマルチプレートに4×10⁴個/ウェルの濃度で蒔いた。5%CO₂、30%O₂、65%N₂の存在下、37°Cで24時間培養後、5 U/mlアプロチニンを添加したDME・F-12混合培地に交換し、同培養条件下で48時間培養した。培地を新しく調製した5 U/mlアプロチニン添加DME・F-12混合培地に交換すると共に被検試料として参考例1で得られたラットHGF(0.25%BSAを加え、PBSで透析したもの)、及び陽性対照として10ng/mlEGF(上皮細胞成長因子、雄マウス頸下腺由来)+1×10⁻⁷Mインスリンを所定量添加した。16時間培養後、1 μCi/mlの[¹²⁵I]デオキシリジン(ニューイ

ングランドニューカレア社、米国)10 μl/ウェルを添加した。4時間後、PBSで細胞を洗浄し、10%トリクロロ酢酸溶液に移し、5分間インキュベートした。トリクロロ酢酸を除去し、1M水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、放射能をガンマカウンターにて測定した。その結果を図9に示す。図9から明らかのように、ラットHGFはラット腎臓の近位尿細管細胞を用量依存的に増殖させる活性を示した。すなわち、2ng/mlのHGFを添加することにより、該培養細胞のDNA合成は約2倍に、10 ng/mlのHGFにより約3倍に促進された。これにより本発明の有効成分であるHGFは培養腎細胞を増殖させる活性を有することが明らかになると共に、生体内における腎再生を促進させる活性を有することが明らかとなった。

【0025】試験例6

ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。MCDB153(高アミノ酸タイプ)培地にインスリン5 μg/ml、ヒドロコーチゾン0.5 μg/ml、フォルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト(クラボウ株式会社)を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果を図10に示す。図10に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

【0026】試験例7

ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

試験例6に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メ

ラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個／ウェルになるように蒔き、10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマーカウンターにより測定した。また、放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当たりに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。その結果を図11に示す。図11に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成が促進され、最適濃度において約4倍にまで高められることが確認された。

【0027】試験例8

ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。試験例6に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 10^4 個／ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培養を続け、4日後(培養開始から10日後)培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果を図12に示す。図12に示されるように、正常ケラチノサイトはHGFにより0から2.5ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

【0028】試験例9

ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

試験例6記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチ

ノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個／ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、6.5%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて2回洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマーカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当たりに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。その結果を図13に示す。図13に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から5ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

【0029】試験例10

動物におけるHGFの保護作用

本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFの動物における保護作用を下記試験例に示す。HGFによる保護作用は、体重、肝重量及び腎重量により試験した。即ち、制ガン剤であるシスプラチンを実験動物に投与すると、体重、肝重量、腎重量が減少する。この時、HGFを動物に投与し、保護作用を試験した。動物は、BALB/c雄性マウス9週令を使用した。シスプラチンは、日本化薬社製ランダ注を腹腔内に5mg/kg又は10mg/kgとなるように投与した。HGF溶解液は0.25%BSA、0.01%Tween 80を含むPBS(-)を用い、0.1mg/mlとなるようにHGFを溶解して、マウス1匹当たり0.1mlを尾静脈より1日2回、12時間毎に投与した(10μg/マウス×2回/日×4日)。HGFは、シスプラチン投与日を含めて連続4日間投与し、5日目に開腹し、肝、腎を摘出し重量を測定した。その結果(それぞれ、一群6匹の試験の平均値)を図14(体重)及び表2(肝重量及び腎重量)に示す。図14及び表2に示されるように、HGFの投与により体重、肝重量及び腎重量の減少を抑制できることが確認された。

【0030】

表2

シスプラチン (mg/kg)	HGF	肝重量 (mg)	腎重量 (mg)
0	-	910± 63	242± 16
	+	1124± 86	253± 16
5	-	941± 89	221± 16
	+	1120± 95	242± 14
10	-	695± 151	205± 23
	+	872± 84	234± 35

【0031】実施例1

生理食塩水100ml中にHGF 100mg、マンニトール1g及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【0032】実施例2

0.15M NaClと0.01%ポリソルベート80を含むpH7.4の0.02Mリン酸緩衝液100mlにHGF 100mgとヒト血清アルブミン100mgを添加した水溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列（1～240番）を示す図である。

【図2】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列（241～495番）を示す図である。

【図3】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列（496～728番）を示す図である。

【図4】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列（図1～図3）をコードする遺伝子の塩基配列（1～1560番）を示す図である。

【図5】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列（図1～図3）をコードする遺伝子の塩基配列（1561～2184番）を示す図である。

【図6】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出量の時間変化を示す図である（試験例1参照）。同図中、○は無添加の系（コントロール）、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系を示す。

【図7】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果（添加量一応答曲線）を示す図である（試験例2参照）。

【図8】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果を示す図である（試験例3参照）。

【図9】ラット近位尿細管細胞に対するラットHGFの増殖促進活性の測定結果を示す図である（試験例5参照）。同図中、●はHGFを添加した系、□はEGF+インスリン（陽性対照）を示す。

【図10】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性（細胞数）を示す図である（試験例6参照）。

【図11】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性（複製DNA合成）を示す図である（試験例7参照）。

【図12】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性（細胞数）を示す図である（試験例8参照）。

【図13】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性（複製DNA合成）を示す図である（試験例9参照）。

【図14】マウスに対するHGFの保護作用（体重変動）を示す図である（試験例10参照）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

1 5 10 15
 Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val

 20 25 30
 Leu Leu His Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu

 35 40 45
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser

 50 55 60
 Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys

 65 70 75
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr

 80 85 90
 Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp

 95 100 105
 Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser

 110 115 120
 Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

 125 130 135
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser

 140 145 150
 Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln

 155 160 165
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser

 170 175 180
 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro

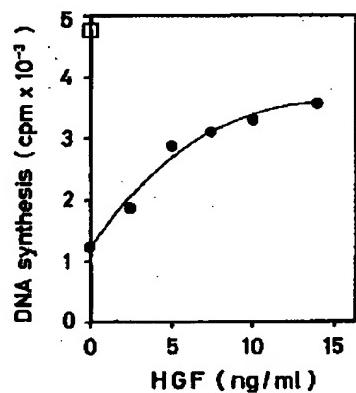
 185 190 195
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Arg Glu

 200 205 210
 Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu

 215 220 225
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His

 230 235 240
 Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro

【図9】



【図2】

245	250	255
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
260	265	270
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
275	280	285
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
290	295	300
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
305	310	315
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
320	325	330
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
335	340	345
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		
350	355	360
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
365	370	375
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
380	385	390
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp		
395	400	405
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
410	415	420
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu		
425	430	435
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu		
440	445	450
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro		
455	460	465
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro		
470	475	480
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
485	490	495
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val		

【図3】

500	505	510
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser		
515	520	525
Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys		
530	535	540
Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp		
545	550	555
Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly		
560	565	570
Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu		
575	580	585
Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala		
590	595	600
Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro		
605	610	615
Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr		
620	625	630
Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg		
635	640	645
Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His		
650	655	660
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly		
665	670	675
Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly		
680	685	690
Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val		
695	700	705
Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile		
710	715	720
Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile		
725	728	
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser		

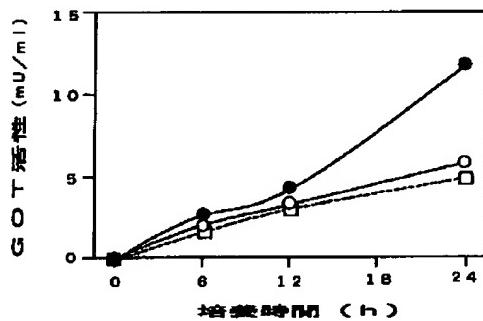
【図4】

ATGTGGGTGA CCAAACCTCCT GCCAGCCCTG CTGCTGCAGC ATGTCCCTCCT GCATCTCCTC 60
 CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
 GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA 180
 ACCAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAAAGGACTT 240
 CCATTCACTT GCAAGGCTTT TGTGTTGAT AAAGCAACAA AACAAATGCCT CTGGTTCCCC 300
 TTCAATAGCA TGTCAAGTGG ACTGAAAAAA GAATTGGCC ATGAATTGAA CCTCTATGAA 360
 AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGGATCATT GGTAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA 420
 TCTATCACTA AGAGTGGCAT CAAATGTCAG CCCTGGAGTT CCATGATAACC ACACGAACAC 480
 AGCTTTTGC CTTCGAGCTA TCGGGGTAAA GACCTACAGG AAAACTACTG TCGAAATCCT 540
 CGAGGGGAAG AAGGGGGACC CTGGTGTTC ACAAGCAATC CAGAGGTACG CTACGAAGTC 600
 TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAACTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGA GACTTATCGA 660
 GGTCTCATGG ATCATAACAGA ATCAGGCAAG ATTTGTCAAG GCTGGATCA TCAGACACCA 720
 CACCGGCACA AATTCTTGCC TGAAAGATAT CCCGACAAGG GCTTGATGA TAATTATTGC 780
 CGCAATCCCG ATGCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCCTCA CACCCGCTGG 840
 GAGTACTCTG CAATTAACAC ATGCCGTGAC AATACTATCA ATGACACTGA TGTTCCCTTG 900
 GAAACAACIG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCATT 960
 TGGAAATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCACTATC CTCACGGAGCA TGACATGACT 1020
 CCTGAAATT TCAACTGCAA GGACCTACCA GAAAATTACT GCCGAAATCC AGATGGGTCT 1080
 GAATCACCCCT GGTGTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGCTACTG CTCCCAAAATT 1140
 CCAAACCTGTG ATATGTCACA TGGACAAGAT TGTTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1200
 GGCAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGACAA GAACATGAA 1260
 GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1320
 CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGTACA CGGGAAATCC ACTCATTCC 1380
 TGGGATTATT GCCCTATTTC TCGTTGTGAA GCTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTAA 1440
 GACCATCCCG TAATATCTTG TGCCAAAACG AAACAATTGC GACTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
 ACACGAACAA ACATAGGATG GATGGTTAGT TTGAGATACA GAAATAAAACA TATCTGCGGA 1560

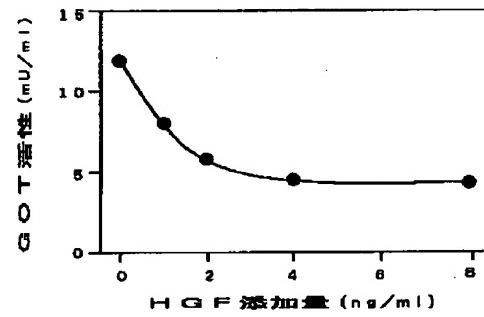
【図5】

GGATCATTGA TAAAGGAGAG TTGGGTTCTT ACTGCACCGAC ACTGTTCCC TTCTCGAGAC 1620
 TTGAAAGATT ATGAAGCTTG GCTTGGATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
 TGCAAAACAGG TTCTCAATGT TTCCCAGCTG GTATATGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
 TTAATGAAGC TTGCCAGGCC TGCTGTCTG GATGATTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
 AATTATGGAT GCACAATTCC TGAAAAGACC AGTTGCAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1860
 GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
 AAATGCAGCC AGCATCATCG AGGGAAAGGTG ACTCTGAATG ACTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
 GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTGCTGAG 2040
 CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTGTG ATTGTTCTG GTGGTGGATG TGCCATTCCA 2100
 AATCGTCCTG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAAATTATT 2160
 TTAACATATA AGGTACCAACA GTCA 2184

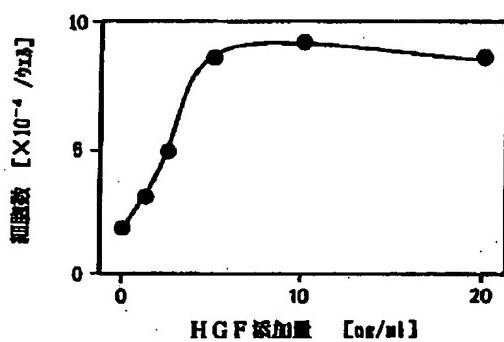
【図6】



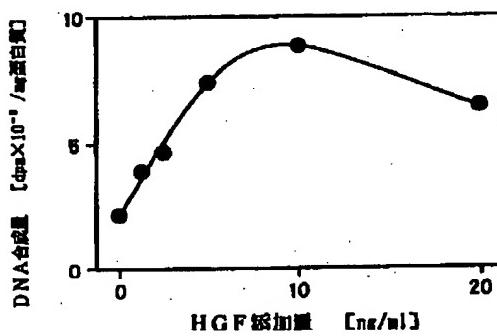
【図7】



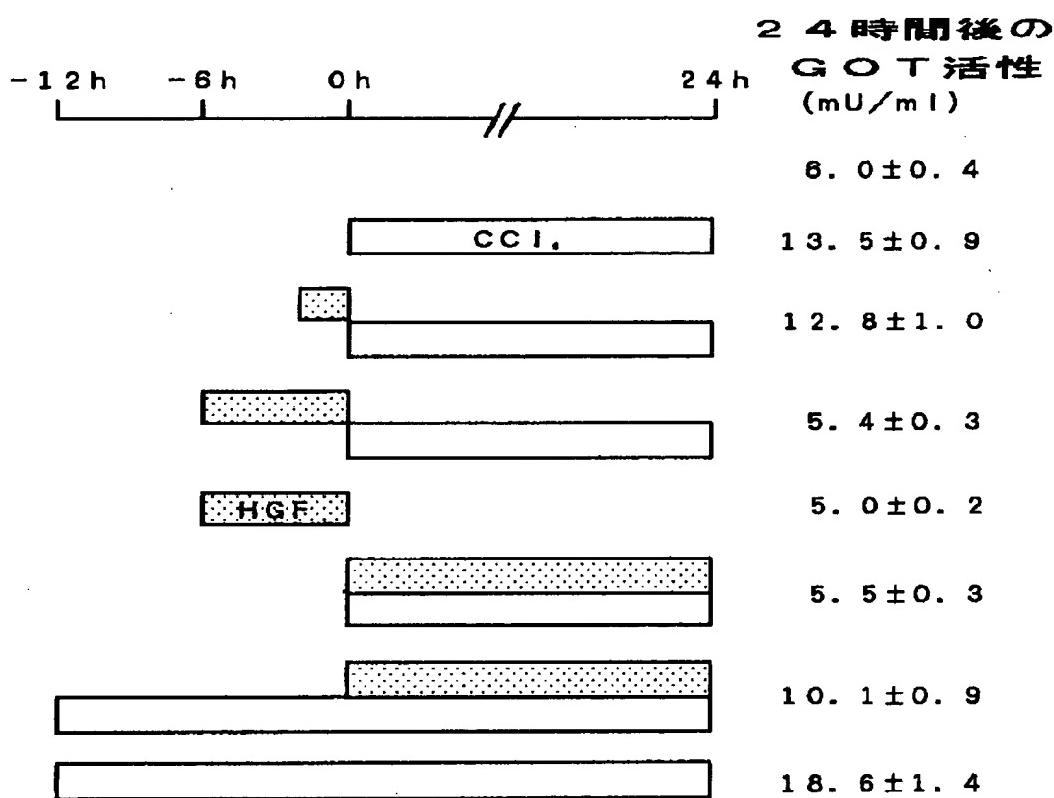
【図10】



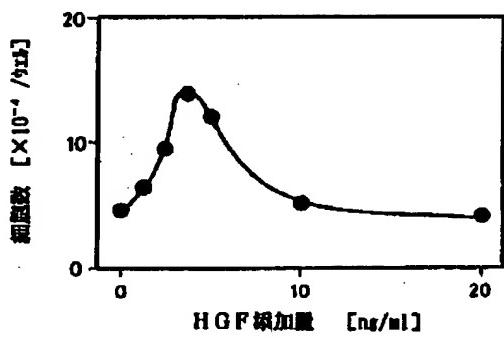
【図11】



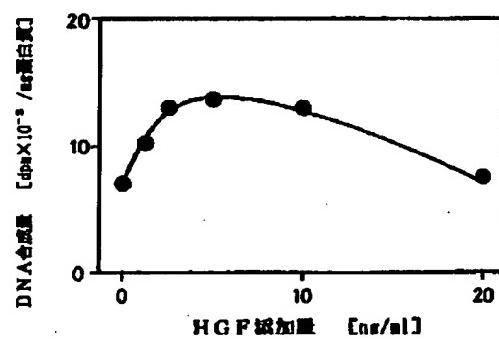
【図8】



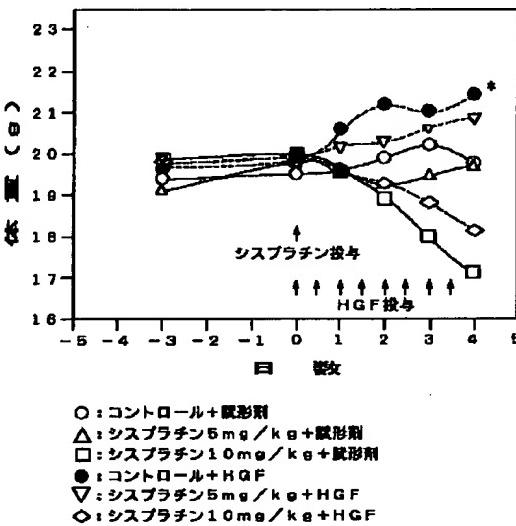
【図12】



【図13】



【図14】



【手続補正書】

【提出日】平成5年9月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(1~240番)を示す図である。

【図2】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(241~495番)を示す図である。

【図3】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(496~728番)を示す図である。

【図4】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(図1~図3)をコードする遺伝子の塩基配列(1~1560番)を示す図である。

【図5】ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(図1~図3)をコードする遺伝子の塩基配列(1561~2184番)を示す図である。

【図6】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出量の時間変化を示す図である。同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系を示す。

【図7】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果(添加量-応答曲線)を示す

図である(試験例2参照)。

【図8】四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果を示す図である(試験例3参照)。

【図9】ラット近位尿細管細胞に対するラットHGFの増殖促進活性の測定結果を示す図である(試験例5参照)。同図中、●はHGFを添加した系、□はEGF+インスリン(陽性対照)を示す。

【図10】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性(細胞数)を示す図である(試験例6参照)。

【図11】ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性(複製DNA合成)を示す図である(試験例7参照)。

【図12】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性(細胞数)を示す図である(試験例8参照)。

【図13】ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性(複製DNA合成)を示す図である(試験例9参照)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

1 5 10 15
 Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val

 20 25 30
 Leu Leu His Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu

 35 40 45
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser

 50 55 60
 Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys

 65 70 75
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr

 80 85 90
 Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp

 95 100 105
 Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser

 110 115 120
 Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

 125 130 135
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser

 140 145 150
 Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln

 155 160 165
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser

 170 175 180
 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro

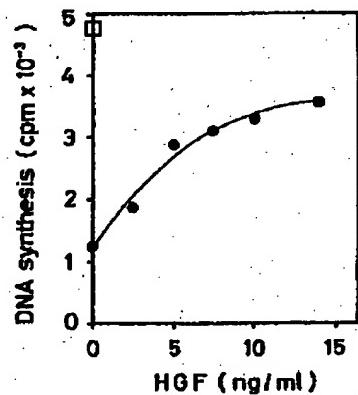
 185 190 195
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Arg Glu

 200 205 210
 Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu

 215 220 225
 Cys Met Thr Cys Asn Gln Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His

 230 235 240
 Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro

【図9】



【図2】

245	250	255
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
260	265	270
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
275	280	285
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
290	295	300
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
305	310	315
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
320	325	330
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
335	340	345
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		
350	355	360
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
365	370	375
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
380	385	390
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp		
395	400	405
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
410	415	420
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu		
425	430	435
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu		
440	445	450
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro		
455	460	465
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro		
470	475	480
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
485	490	495
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val		

【図3】

500	505	510
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser		
515	520	525
Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys		
530	535	540
Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp		
545	550	555
Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly		
560	565	570
Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu		
575	580	585
Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala		
590	595	600
Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro		
605	610	615
Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr		
620	625	630
Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg		
635	640	645
Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His		
650	655	660
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly		
665	670	675
Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly		
680	685	690
Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val		
695	700	705
Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile		
710	715	720
Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile		
725	728	
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser		

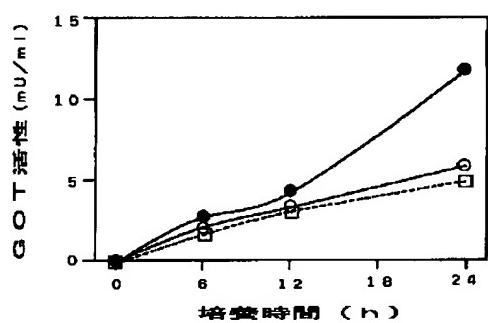
【図4】

ATCTGGTGA CCAAACCTCCT GCCAGCCCTG CTGCTGCACC ATGTCCTCCT GCATCTCCTC 60
 CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAACGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
 GAATTCAAAA AATCAGCATA GACTACCCCTA ATCAAAATAG ATCCAGGACT GAAGATAAAA 180
 ACCAAAAAAAG TGAAATACTGC AGACCAATGT CCTAATAGAT GTACTACGAA TAAACCACTT 240
 CCATTCACTT GCAAGGCTTT TGTTTTGAT AAAGCAAGAA AACAAATGCCT CTGGTTCCCC 300
 TTCAATAGCA TGTCAAGTGG AGTCAAAAAA CAATTTGCC ATGAATTGAA CCTCTATGAA 360
 AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT GGTAAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA 420
 TCTATCACTA AGACTGGCAT CAAATCTCAG CCCTGGACTT CCATGATAAC ACACGAACAC 480
 ACCTTTTGC CTTCGAGCTA TCGGGTAAA GACCTACAGG AAAACTACTG TCGAAATCCT 540
 CGAGGGGAAG AAGGGGGACC CTGGTGTTC ACAAGCAATC CAGAGGTAGG CTACGAAGTC 600
 TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAACTTGAA TCCATGACCT GCAATGGGA GAGTTATCGA 660
 GGTCTCATGG ATCATAACAGA ATCAGGCAAG ATTTCICAGC GCTGGATCA TCAGACACCA 720
 CACCGGCACA AATTCTTGCC TGAAAGATAT CCCGACAAAGG GCTTTGATGA TAATTATTGC 780
 CGCAATCCCC ATGCCAGGCC GAGGCCATGG TCCTATACTC TTGACCCCTCA CACCCGCTGG 840
 GACTACTGTC CAATTAAAC ATGCGCTGAC AATACTATGA ATGACACTGA TCTTCCTTTC 900
 GAAACAACG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCAATT 960
 TGGAAATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCAGTATC CTCACGGAGCA TGACATGACT 1020
 CCTGAAAATT TCAAGTGCAGA GGACCTACGA GAAAATTACT GCGGAAATCC AGATGGGTCT 1080
 GAATCACCCCT GGTGTTTAC CACTGATCCA AACATCCAG TTGGCTACTG CTCCCAAATT 1140
 CCAAACCTG ATATGTACA TGGACAAGAT TCTTATCGT GCAATGGCAA AAATTATATG 1200
 GGCAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGACAA GAACATGGAA 1260
 GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGCC 1320
 CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGCTACA CGGGAAATCC ACTCATTGCT 1380
 TGGCATTATT CCCCTATTTC TCGTTGTCAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTAA 1440
 GACCATCCCG TAATATCTTG TGCCAAAACG AAACAATTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
 ACACCAACAA ACATAGGATG GATGGTTAGT TTGAGATACA CAAATAAACAA TATCTGGGA 1560

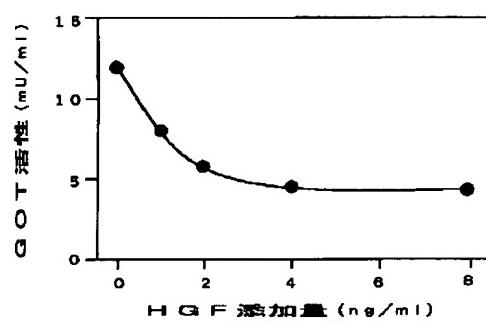
【図5】

GGATCATTGA TAAAGGAGAG TTGGGTTCTT ACTGCACGAC AGTGTTCGG TTCTCGAGAC 1620
 TTGAAAGATT ATGAAGCTTG GCTTGGATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
 TGCAAAACAGG TTCTCAATGT TTCCCAGCTG GTATATGGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
 TTAATGAACC TTGCCAGGCC TCCTGTCTG GATGATTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
 AATTATGGAT GCACAATTCC TCAAAAGACC AGTTGCAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1860
 GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
 AAATGCAGCC ACCATCATCG AGGGAAACGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
 GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAC GGGGATTATC GTGGCCCACT TGTGCTGAG 2040
 CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTGTG ATTGTTCTG GTCGTGGATG TGCCATTCCA 2100
 AATCGTCCTG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAAATTATT 2160
 TTAACATATA ACCTACCAACA GTCA 2184

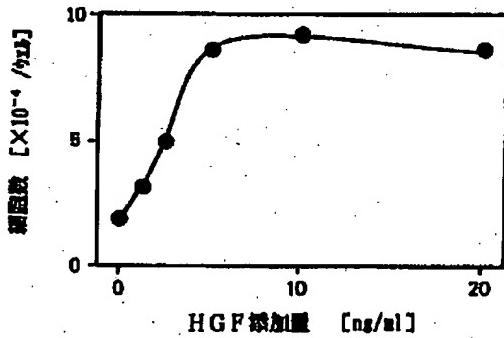
【図6】



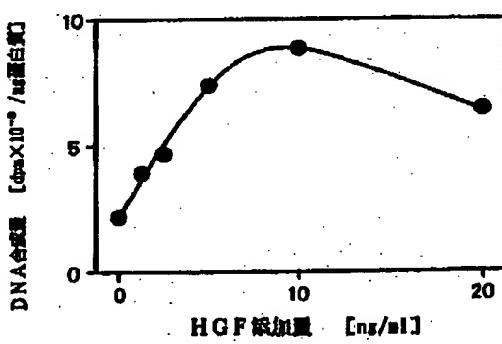
【図7】



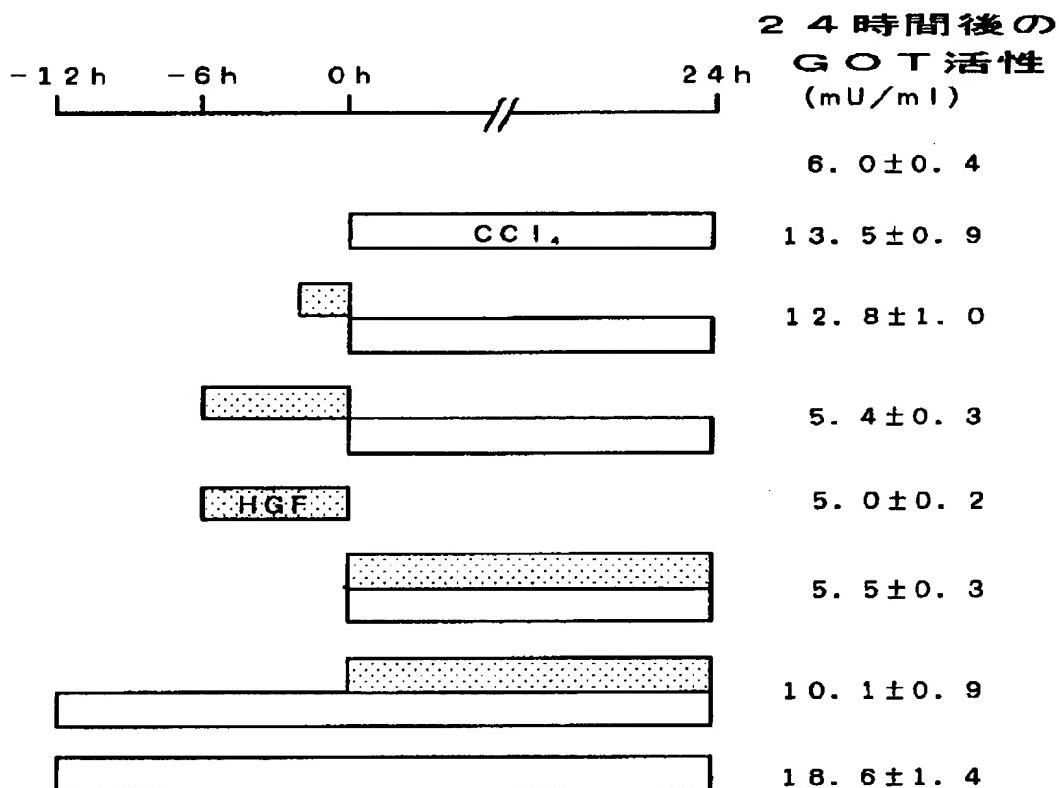
【図10】



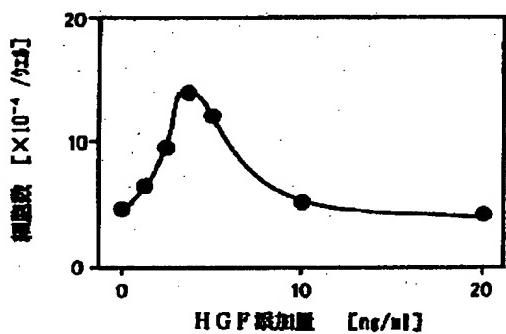
【図11】



【図8】



【図12】



【図13】

